

D4

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. März 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/020125 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61B 5/00** [DE/DE]; Hasseler Chaussee 23, 66386 St. Ingbert (DE).  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/09267 ROBITZKI, Andrea [DE/DE]; Brunhildstrasse 8, 68519 Viernheim (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 2002 (20.08.2002) (74) Anwalt: RÖSLER, Uwe; Landsberger Strasse 480a, 81241 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaat (*national*): US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität: 101 42 393.4 30. August 2001 (30.08.2001) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, 81241 München (DE).

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): THIELECKE, Hagen

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DETECTING BIOELECTRIC SIGNALS FROM ELECTROPHYSIOLOGICALLY ACTIVE REGIONS IN SPHEROIDS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR ERFASSUNG BIOELEKTRISCHER SIGNALE AUS ELETROPHYSIOLOGISCH AKTIVEN BEREICHEN IN SPHÄROIDEN

WO 03/020125 A2

(57) Abstract: The invention relates to a device and a method for detecting bioelectric signals from spheroids. Said device comprises a measuring chamber having a wall enclosing a volume which is open on at least one side, consisting of non-electroconductive material, and comprising an inner cross-section at least in a measuring area, corresponding as far as possible to the largest cross-section of a spheroid. The inventive device also comprises at least a number of electrodes which are arranged in a common plane inside the wall of the measuring chamber, and each comprise one freely accessible electrode surface which is oriented towards the measuring area. Said device further comprises an impedance measuring system which is connected to the electrodes. The device and the method can be used in active ingredients tests on biological in vitro 3D (three-dimensional) cell agglomerates.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum Erfassen bioelektrischer Signale aus Sphäroiden mit einer Messkammer mit einer Messkammerwand, die ein zumindest einseitig offenes Volumen umschliesst, aus elektrisch nicht leitendem Material besteht und zumindest in einem Messbereich einen Innenquerschnitt aufweist, der maximal dem grössten Querschnitt eines Sphäroids entspricht, mindestens einer Anzahl von Elektroden, die in einer gemeinsamen Ebene innerhalb der Messkammerwand angeordnet sind und jeweils eine, zum Messbereich orientierte frei zugängliche Elektrodenoberfläche aufweisen, sowie einer Impedanzmessanordnung, die mit den Elektroden verbunden sind. Die Vorrichtung sowie das Verfahren lassen sich zu Wirkstofftests an biologischen in vitro 3D (dreidimensionalen) Zellaggregaten einsetzen.

## Vorrichtung und Verfahren zur Erfassung bioelektrischer Signale aus elektrophysiologisch aktiven Bereichen in Sphäroiden

### **Technisches Gebiet**

Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung sowie auf ein Verfahren zum Erfassen bioelektrischer Signale aus elektrophysiologisch aktiven Bereichen in Sphäroiden. Insbesondere wird dargelegt, wie die Wirkung pharmazeutischer vorzugsweise neuropharmakologischer oder neurotoxischer Wirkstoffe auf Sphäroide erfasst werden können ohne dabei die Sphäroide zu schädigen, so dass sie weiteren Untersuchungsmöglichkeiten zu Verfügung stehen können.

### **Stand der Technik**

Um die Wirkung von Substanzen, bspw. pharmakologische Wirkstoffe auf lebende Systeme routinemäßig erfassen zu können, sind in den letzten Jahren Biosensoren entwickelt worden, die auf lebenden Zellen basieren, siehe hierzu Bousse, L.: "Whole Cell Biosensors", Sensors and Actuators Band 34, 270-275 (1996). Derartige, auf biologischen Zellen basierende Biosensoren weisen hauptsächlich Monolayer-Zellkulturen als biologisches Erkennungssystem auf, doch können Wirkstoff-verursachte komplexe Zell/Zell- oder Zell/Matrix-Interaktionen durch derartige Monolayer-Zellkulturen oft nicht mit der gewünschten Genauigkeit und Zuverlässigkeit technisch erfasst werden. Hinzukommt, dass die Wirkung von Neuropharmaka oder Umwelttoxine eben gerade jene komplexe Zell/Zell-Interaktionen im Zentralen Nervensystem zur Folge haben, die es gilt messtechnisch zu erfassen, um weitere Einblicke in die biochemische Reaktionskette derartiger Substanzen auf biologisches Zellmaterial zu erhalten. Schließlich weisen die auf

Monolayer-Zellkulturen basierenden Biosensoren den Nachteil auf, dass die mit diesen Sensoren erhältlichen Messergebnisse nur über einen beschränkten Aussagegehalt über das tatsächliche Reaktionsvermögen biologischer Zellen bspw. auf einen gezielten Wirkstoffeintrag, verfügen, zumal die Monolayer-Zellkulturen in dieser Form in der belebten Natur nicht vorkommen.

Um diesen Nachteil zu vermeiden ist man bei der Untersuchung derartiger Substanzen vielmehr auf biologische Modelle angewiesen, die der *in vivo* Situation hinsichtlich der interzellulären sowie intrazellulären Interaktionen möglichst nahe kommen. Dreidimensionale Zellsysteme spiegeln die *in vivo* Situation wesentlich besser wider als einzelne Zellen oder Monolayer-Zellkulturen. Somit ist es notwendig, zum Test von Wirkstoffen, die auf die Beeinflussung der Zell/Zell-Interaktionen zielen, dreidimensionale Zellsysteme zu verwenden.

Um die neuropharmakologischen oder neurotoxischen Wirkung von Substanzen bspw. außerhalb von Tiermodellen zu Testen, werden in an sich bekannter Weise bioelektrische Signale von *ex vivo* Gewebeschnitten mit Hilfe von Glasmikroelektroden oder Nadelelektroden abgeleitet. Zur Aufzeichnung von Signalverläufen mittels Multikanalableitungen werden planare Elektrodenanordnungen, sogenannte Multielektrodenarrays eingesetzt. Jedoch müssen *ex vivo* Gewebeschnitte aufwendig aus Tiermodellen präpariert werden, sind nicht standardisierbar und auf die vorhandenen Tiermodelle beschränkt. Da überdies *ex vivo* Gewebeschnitte schnell degenerieren, sind Gewebeschnitte für Langzeituntersuchungen nicht geeignet. Dies jedoch wäre bei der Untersuchung von Neuropharmaka oder Umwelttoxine und ihr Einfluss auf biologische Gewebe von äußerst hoher Relevanz.

Ein interessantes Untersuchungsobjekt für die vorstehend aufgeworfene Fragestellung sind sogenannte Sphäroide, die als kugelförmige Zellaggregate aufgefasst werden können. Aus der Literatur sind bspw. Untersuchungen der Retinogenese und der Retinaregeneration bekannt, bei denen unter konstanten Bedingungen derartige regenerierte kugelförmige Zellaggregate, sogenannte

Retinosphäroide, gewonnen werden (siehe hierzu Moscona, A. A.: "Development of Heterotypic Combination of Dissociated Embryonic Chick Cells". Proc. Soc. Exp. Bio. Med 292, 410-416 (1956); Vollmer, G., Layer, P. G., Gierer, A.: "Reaggregation of Embryonic Chick Retina Cells: Pigment Epithelial Cells Induce a High Order of Stratification". Neurosci. Lett. 48, 191-196 (1984)). Diese werden durch geeignete Kultivierung von dissoziierten Zellen aus embryonalen Retinae reaggregiert.

In der DE 199 46 458.8 wird hierzu eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zur Charakterisierung von Sphäroiden mittels Impedanzspektroskopie beschrieben. Damit kann der Einfluss von Substanzen auf die Proliferation, Morphologie und Membraneigenschaften der *in vitro* Gewebe, d.h. außerhalb des lebenden Organismus, bestimmt werden. Ortsaufgelöste Informationen aus dem Inneren des Sphäroids können jedoch mit der bekannten Methode nicht gewonnen werden. Auch ist es mit der in vorstehender Druckschrift beschriebenen Vorrichtung nicht möglich Informationen über intrazelluläre elektrische Potentiale in Form sogenannter bioelektrischer Signale zu erhalten, an Hand derer die Wirkung pharmazeutischer Wirkstoffe, insbesondere von neuropharmakologischen oder neurotoxischen Wirkstoffen erfasst werden kann.

### Darstellung der Erfindung

Es besteht die Aufgabe eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum Erfassen bioelektrischer Signale aus Sphäroiden derart anzugeben, dass es möglich ist die neurotoxische und neuropharmakologische Wirkung von Substanzen auf biologisches Material im Wege einer *in vitro* Untersuchung möglichst nahe an der *in vivo* Situation hinsichtlich der interzellulären sowie intrazellulären Interaktionen zu erfassen.

Die Lösung der der Erfindung zugrundeliegenden Aufgabe ist im Anspruch 1 angegeben. Gegenstand des Anspruches 14 ist ein erfindungsgemäßes Verfahren. Den Erfindungsgedanken vorteilhaft weiterbildende Merkmale sind Gegenstand der Unteransprüche sowie der Beschreibung unter Bezugnahme auf die Ausführungsbeispiele zu entnehmen.

Erfnungsgemäß weist die Vorrichtung zum Erfassen bioelektrischer Signale aus Sphäroiden die nachfolgenden Komponenten auf:

- Eine Messkammer mit einer Messkammerwand, die ein zumindest einseitig offenes Volumen umschließt, aus elektrisch nicht leitendem Material besteht und zumindest in einem Messbereich einen Innenquerschnitt aufweist, der maximal dem größten Querschnitt eines Sphäroids entspricht.  
Vorzugsweise ist die Messkammer als Kapillare ausgebildet, mit Kapillarwänden und einem Kapillarboden, die den Messbereich für das Sphäroid definieren. Die Querschnittsgröße des von den Kapillarwänden eingeschlossenen Messbereiches ist derart gewählt, dass das Sphäroid längs seines größten Umfangsrandes in mechanischen Kontakt zur Messkammer- bzw. Kapillarwand steht, so dass das Sphäroid innerhalb des Messbereiches eine möglichst feste Raumlage einnimmt, die für die weitere Messung des Sphäroids von großem Vorteil ist. Um die Positionierung des Sphäroids innerhalb der Messkammer bzw. Kapillare weiter zu verbessern ist in einer bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung im Kapillarboden eine Unterdruckleitung angeschlossen, um das Sphäroid mittels Saugwirkung regelrecht in innerhalb des Messbereiches zu fixieren.
- Mindestens eine Anzahl von Elektroden sind in einer gemeinsamen Ebene innerhalb der Messkammerwand angeordnet, wobei die Elektroden jeweils eine, zum Messbereich orientierte frei zugängliche Elektrodenoberfläche aufweisen. Die Elektroden sind vorzugsweise in jener Ebene innerhalb der Messkammerwand angeordnet in der das Sphäroid mit seinem größten Umfangsrand die Messkammerwand berührt. Die vorstehende Forderung, dass die Elektroden in einer Ebene angeordnet sind, ist nicht notwendigerweise mathematisch exakt zu verstehen, d.h. im Sinne längs einer, der Messkammerinnenwand umlaufenden gedachten Linie. Die Elektroden sollten zumindest mit ihren zum Messbereich orientierten Elektrodenoberflächen längs des Kontaktbereiches zwischen Sphäroid und Messkammerwand angeordnet sein, so dass es mit einer an die einzelnen Elektroden angeschlossenen Impedanzmessanordnung möglich ist die Impedanzverteilung ortsaufgelöst in der durch die Elektrodenanordnung

vorgegebenen Schnittebene innerhalb des Sphäroids zu ermitteln. Hierbei wird über die einzelnen Elektroden innerhalb des Sphäroids ein elektrischer Strom induziert und die über dem Sphäroid abfallende elektrische Spannung gemessen. Aus Strom und Spannung wird die Impedanz gebildet. Zur Durchführung eines sogenannten Impedanzimaging wird die Frequenz des in den Sphäroid induzierten Stroms über einen zusammenhängenden Frequenzbereich variiert und die sich dabei ergebende Impedanz als Funktion der Frequenz aufgezeichnet. So ist es mit Hilfe eines derartigen Impedanzimaging-Systems möglich aus der aufgezeichneten Impedanzverteilung bei verschiedenen Frequenzen die Gewebeparameter innerhalb der Schnittebene ortsaufgelöst zu ermitteln. Man erhält auf diese Weise Kenntnis über den inneren Aufbau des Sphäroids innerhalb der Schnittebene. So zeichnen sich sogenannte elektrophysiologisch aktive Bereiche durch eine in der Konsistenz kompakte Untereinheit aus, die sich von übrigen nicht organisierten Bereichen innerhalb des Sphäroids im Impedanzverhalten zu unterscheiden vermögen. Eben gerade jene elektrophysiologisch aktiven Bereiche sind von großem Interesse bei der Fragestellung der Auswirkung bestimmter Wirkstoffe auf biologische Zellen, zumal in diesen Bereichen als eine Art Zellantwort auf das Einwirken eines Wirkstoffes auf die jeweilige Zelle technisch erfassbare und auswertbare Signale erzeugt werden. So verfügen elektrophysiologisch aktive Bereiche innerhalb des Sphäroids über eine bioelektrische Aktivität, durch die das elektrische Oberflächenpotenzialverhalten des gesamten Sphäroids beeinflusst wird. Ändert sich bspw. durch Einwirken einer bestimmten Substanz auf das Sphäroid und damit zugleich auf die elektrophysiologisch aktiven Bereiche dessen bioelektrische Aktivität, so wirkt sich dies direkt auf das Oberflächenpotenzial des Sphäroids aus. Vorzugsweise mit Hilfe eines Potenzialableitungssystems, das mit den um das Sphäroid angeordneten Elektroden verbunden ist, ist man in der Lage Oberflächenpotenziale längs der Schnittebene durch das Sphäroid zu erfassen und letztendlich eine Information über die bioelektrische Aktivität der innerhalb der Schnittebene befindlichen elektrophysiologisch aktiven Bereiche zu erhalten.

Sowohl für die Impedanzmessung als auch für das Erfassen der Oberflächenpotenziale müssen die freien Elektrodenoberflächen nicht

notwendigerweise in unmittelbaren Kontakt zur Oberfläche des Sphäroids stehen. Vielmehr dient auch eine innerhalb der Messkammer eingebrachte Kulturflüssigkeit, die bspw. das Nährmedium darstellt innerhalb der das Sphäroid gezüchtet wird, als elektrisch leitendes Medium, durch das ein elektrischer Kontakt zwischen den Elektroden und der Oberfläche des Sphäroids herstellbar ist.

In einer einfachen Ausführungsform schließen die freien Elektrodenoberflächen bündig mit der Innenwand der Messkammer ab, so dass ein direkter Kontakt zwischen den Elektrodenoberflächen und dem Sphäroid vorherrscht.

In einer alternativen Ausführungsform befinden sich die Elektroden derart innerhalb sogenannter Verbindungskammern, die einseitig offen in die Messkammer münden, dass die freien Elektrodenoberflächen von der Messkammerinnenwand zurückversetzt sind. Dies hat zunächst den Vorteil, dass die Elektroden leichter austauschbar bzw. auswechselbar sind und überdies können bei geeigneter geometrische Ausbildung und Anordnung der Verbindungskammern, bspw. zur Messkammer konisch zulaufend, größere freie Elektrodenoberflächen eingesetzt werden. In Hinblick auf eine möglichst geringe Phasengrenzimpedanz ist der Einsatz möglichst großer Elektrodenflächen wünschenswert, die durch entsprechende beabstandete Anordnung innerhalb konisch ausgebildeter Verbindungskammern von der Messkammerinnenwand realisierbar sind. Wie bereits vorstehend erwähnt dient die Kulturflüssigkeit, die zusammen mit dem Sphäroid in der Messkammer eingebracht ist, als elektrisches Kontaktmedium zwischen den Elektroden und der Sphäroidoberfläche.

Insbesondere in Hinblick auf die Untersuchung von Sphäroiden im industriellen Massstab, um die Wirkungsweise neuer pharmakologischer Wirkstoffe zu testen, eignen sich Halbleitermaterialien für den Aufbau der vorstehend beschriebenen Vorrichtung. Mit den Mitteln der Halbleitertechnik lassen sich eine Vielzahl arrayförmig angeordneter Messkammern realisieren, die in Form und Größe für Untersuchung von Sphäroiden angepasst sind und erlauben somit eine statistische Auswertung aufgrund einer großen Anzahl untersuchter Sphäroide. Ein konkretes

Ausführungsbeispiel hierzu wird unter Bezugnahme der im weiteren beschriebenen Figuren genauer dargelegt.

Mit Hilfe der vorstehenden Vorrichtung lassen sich Sphäroide, ohne sie zu zerstören, auf ihre bioelektrische Aktivität hin untersuchen, um sie nachfolgend schadlos zur weiteren Beobachtung in ein Kulturmedium zurückzuführen. So ist es möglich ein und dasselbe Sphäroid in zeitlichen Abständen mehrmals zu vermessen, um etwaige Wirkstoff-bedingte Degradationserscheinungen feststellen zu können. Hierdurch können nach Auswertung einer Vielzahl derartiger Sphäroide, die innerhalb eines Kulturmediums zusätzlich einem bestimmten Wirkstoff ausgesetzt sind, statistische Aussagen über die Wirkungsweise von Wirkstoffen getroffen werden.

Im besonderen zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Erfassung bioelektrischer Signale aus Sphäroide durch die Kombination folgender Verfahrensschritte aus: Bereitstellen einer Vorrichtung der vorstehend beschriebenen Art, Einbringen und Positionieren eines Sphäroids innerhalb der Messkammer sowie Durchführen einer Impedanzmessung nach der Impedanzimaging-Methode zur ortsaufgelösten Bestimmung elektrophysiologisch aktiver Bereichen in dem Sphäroid. Um die bioelektrische Aktivität bestimmen zu können wird zusätzlich eine Oberflächenpotenzialmessung längs der durch die Elektrodenanordnung vorgegebenen Schnittebene durchgeführt.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens kann zum einen die Morphologie von multizellulären Sphäroiden ortsaufgelöst und nicht invasiv bestimmt und zudem können die Erregungsverläufe von elektrophysiologisch aktiven Bereichen in Sphäroiden präzise ermittelt werden. Insbesondere ermöglicht das Verfahren, dass die Wirkung von Substanzen bzw. Wirkstoffen auf 3D *in vitro* Modelle des zentralen Nervensystems non invasiv erfasst werden kann. Durch die vorstehend erläuterte Vorrichtung im Sinne eines Biosensorsystems können Langzeituntersuchungen der neurotoxischen und neuropharmakologischen Wirkung von Substanzen realisiert werden. Das biologische Erkennungselement eingesetzte Sphäroid wird nur für einen kurzen Zeitraum während der Impedanzmessung und Potenzialableitung in die

Messkammer positioniert und kann unabhängig von der Messanordnung unter physiologischen Bedingungen kultiviert werden. Eine Adhäsion des Sphäroids wird durch die Gegenwart der Kulturflüssigkeit innerhalb der Messkammer weitgehend verhindert und unerwünschte Zell/Material-Wechselwirkungen werden minimiert. Je nach Fragestellung können somit für das Biosensorsystem Sphäroide oder 3D biologische Erkennungselemente mit unterschiedlichen Zelltypen in unterschiedlichen Lagen erzeugt werden.

### **Kurze Beschreibung der Erfindung**

Die Erfindung wird nachstehend ohne Beschränkung des allgemeinen Erfindungsgedankens anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf die Zeichnung exemplarisch beschrieben. Es zeigen:

- Fig. 1 Schematische Flussdiagrammdarstellung zur Durchführung des Analyseverfahrens,
- Fig. 2 a,b Darstellungen einer Messkammer mit Sphäroid,
- Fig. 3 a,b,c Querschnittsdarstellungen durch ein Sphäroid sowie Potentialbildaufnahme,
- Fig. 4 Querschnitt durch eine arrayförmige Messanordnung in Halbleitertechnologie,
- Fig. 5 Messanordnung,
- Fig. 6 Querschnitt durch eine Messkammer sowie
- Fig. 7 Querschnitt durch eine alternative Messkammer.

### **Wege zur Ausführung der Erfindung, gewerbliche Verwendbarkeit**

Am Beispiel der Untersuchung von reaggregierten Retinospheroiden soll das erfindungsgemäße Verfahren unter Bezugnahme auf Figur 1 erläutert werden:

Dissoziierte embryonale Zellen des zentralen Nervensystems werden in einem Bioreaktor 1 unter Mikrogravitationsbedingungen zu kugelförmigen neuronalen Reaggregationskulturen den sogenannten Retinospäroiden reaggregiert. Durch

Zugabe von geeigneten Wachstumsfaktoren und/oder durch geeignete genetische Manipulationen wird erreicht, dass sich elektrophysiologisch aktive Zellbereiche im Sphäroid gleich verteilt ausbilden. Somit befindet sich in einer beliebigen Schnittebene, die durch das Zentrum des Sphäroids verläuft, mit hoher Wahrscheinlichkeit mindestens ein elektrophysiologisch aktiver Bereich.

Um die Wirkung einer Substanz auf die Sphäroide zu testen, ist wenigstens ein Sphäroid 2 aus dem Bioreaktor 1 zu isolieren und in Messkammer des Biosensorsystem 3 zu verbringen, um es dort als *in vitro* Modell zu testen. Sowohl im Bioreaktor 1 als auch in der Messkammer des Biosensors 3 befindet sich das Sphäroid 2 in einer Kulturflüssigkeit bzw. Analyt, so dass das Sphäroid beliebig zwischen dem Bioreaktor und der Messkammer ohne dabei Schaden zu erleiden austauschbar ist.

Mittels Multifrequenz-Impedanzimaging 4 wird die Lage und Ausdehnung der verschiedenen Zellbereiche in einer durch die Elektrodenanordnung innerhalb der Messkammer vorgegebenen Querschnittebene bestimmt, und anschließend durch elektrisches Quellenimaging 5 die bioelektrische Aktivität der einzelnen Zellbereichen in der Schnittebene ermittelt. Systeme und Algorithmen für das Impedanzimaging und das elektrische Quellenimaging sind grundsätzliche aus der medizinischen Tomographie bekannt, siehe Webster, J. G.: "Electrical Impedance Tomography". Adam Hilger, Bristol (1990).

Als Parameter 6 für die Wirkung von Substanzen auf das *in vitro* Gewebemodell dienen Änderungen der elektrophysiologischen Aktivität von bestimmten Bereichen im Sphäroid, die Korrelation der elektrophysiologischen Aktivität unterschiedlicher Bereiche sowie die Änderung von Gewebeparametern.

Zur Durchführung des Impedanzimaging und der Potentialableitung wird ein elektrophysiologisch aktiver Sphäroid 2 gemäß Figur 2 im gewünschtem Kulturstadium in eine Messkammer 7 positioniert. Je nach Fragestellung, wie z. B. Langzeituntersuchungen oder dynamische Stimulation, wird die zu prüfende Substanz der Kulturflüssigkeit im Bioreaktor oder der Kulturflüssigkeit in der Messkammer 7 zugegeben. Die Messkammer 7 wird vorzugsweise durch eine

Kapillare 8 gebildet, die im Positionierbereich zylindrisch ausgebildet ist und deren Wand 9 aus elektrisch isolierendem Material besteht. Im Positionierbereich der Kapillare 8 sind in der Kapillarwand 9 in mindestens einer senkrecht zur Längsachse stehenden Ebene eine Vielzahl von Elektroden 10 angeordnet. Da die Elektroden 10 mit ihren freien Elektrodenoberflächen in dem in Figur 2 a, b gezeigten Ausführungsbeispiel bündig zur Messkammerinnenwand angeordnet sind, berühren sie den im Inneren der Messkammer eingebrachten Sphäroid 2 (Fig. 2 b) längs seines größten Umfanges in einer Schnittebene. Die Elektroden sind einzeln von außen zur Ansteuerung elektrisch kontaktiert (nicht dargestellt).

Diese Anordnung dient sowohl zur ortsaufgelösten Bestimmung der passiven elektrischen Eigenschaften des *in vitro* Gewebes als auch zur Bestimmung des räumlichen und zeitlichen Verlaufs der elektrophysiologischen Erregung.

Zur Ermittlung der Impedanzverteilung der Schnittebene des Sphäroids, in der die Elektroden liegen, werden die Elektroden in geeigneter Weise mit einem Impedanzimaging-System verbunden. Aus den Impedanzverteilungen bei verschiedenen Frequenzen werden die Gewebeparameter ortsaufgelöst ermittelt. Hierzu ist in Figur 3 a ein tatsächlicher Schnitt durch ein Sphäroid dargestellt, der typischerweise nicht weiter organisierte Bereiche 11, organisierte Unterbereiche, die sogenannten elektrophysiologisch aktiven Bereiche 12 sowie innere Faserschichten 13 aufweist. In Figur 3b ist ein mittels Impedanzimaging ermitteltes Schnittbild dargestellt, das dem in Figur 3a tatsächlich wiedergegebenen Schnittbild entspricht. Die bioelektrische Aktivität bestimmter Bereiche wird aus den Oberflächenpotentialen, die mit den Elektroden abgeleitet werden, sowie aus der Impedanzverteilung bestimmt, siehe die Diagrammdarstellung in Figur 3c. Bei der Ableitung der Oberflächenpotentiale sind die Elektroden der Messkapillare mit einem Ableitsystem verbunden. Markante auswertbare Messsignale stellen insbesondere die an der Sphäroidoberfläche wahrnehmbaren Spanningspeaks (siehe Diagrammdarstellung) sowie deren zeitliche Aufeinanderfolge ( $\Delta t_1$ ,  $\Delta t_2$ ) dar. Eben jene Messgrößen werden durch die Gegenwart bestimmter Wirkstoffe nachweislich beeinflusst, wodurch Aussagen über die Wirkung bestimmter Substanzen auf biologisches Material getroffen werden können.

In Figur 4 ist eine Messkammeranordnung dargestellt, bei der auf einem planaren Substrat 14 in einer Array-Struktur eine Vielzahl einzelner Messkammern 7 angeordnet sind. Zur Herstellung einer derartigen Messkammeranordnung wird auf einem Siliziumsubstrat 14 eine Siliziumnitridschicht 15 mit ca. 1  $\mu\text{m}$  Dicke abgeschieden. Die Siliziumnitridschicht 15 wird als Membranen von ihrer Unterseite freigelegt. Ferner werden Mikrolöcher 16 mit 20  $\mu\text{m}$  Durchmesser in die Membrane 15 durch Trockenätzen eingebracht. Anschließend wird ein Photolack 17 mit einer Dicke von 40  $\mu\text{m}$  aufgebracht. Im Photolack 17 werden konzentrisch zu den Mikrolöchern zylinderförmige Messkammern 7 (Durchmesser 150  $\mu\text{m}$ ) freigeätzt. Auf dem Photolack 17 wird eine Metallschicht in einer Dicke von 10  $\mu\text{m}$  abgeschieden und so strukturiert, dass die Messkammern 7 von acht kreisförmig angeordneten, äquidistant beabstandeten Elektroden 10 umgeben sind. Anschließend wird erneut eine Photolackschicht 17 (50  $\mu\text{m}$ ) abgeschieden und strukturiert.

Um die Sphäroide beim Einbringen in die einzelnen Messkammern 7 nicht zu schädigen, werden die Kanten der Messkammern 7 abgerundet. Damit ein Unterdruck 18 zur Positionierung der Sphäroide angelegt werden kann, wird die gefertigte Mikrostruktur auf eine Platte mit Bohrung und Schlauchanschluss geklebt. Zur Durchführung einer Messung wird der gesamte Bereich der Messkammer 7 mit einer Kulturflüssigkeit 19 gefüllt, um Adhäsionseffekte zwischen den einzelnen Sphäroiden und der Messkammerwand zu vermeiden.

Die Elektroden 10 die in der Messkammer eingebracht sind gemäß Figur 5 über einen Multiplexer 20 mit einem Impedanzmesssystem 21 und mit einem Potenzialableitsystem 22 verbunden. Die Messdaten werden an eine Datenerfassung- und Analyseeinheit 23 übertragen, die auch den Multiplexer 20 steuert.

Gemäß Ausführungsbeispiel in Figur 6, die einen Querschnitt durch eine Messkammer 7 zeigt, sind sternförmig um die Messkammer 7 konisch zulaufende

Verbindungskammern 24 angeordnet, die in die Messkammer einmünden. Dadurch kann die Größe der Metallelektroden 10, die mit jeweils durch Leiterbahnen 10<sup>a</sup> kontaktiert sind, unabhängig von der Größe der Messkammer gewählt werden, und die Phasengrenzimpedanz der Elektroden 10 lässt sich durch größere Elektrodenflächen verringern.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel gemäß Figur 7 sind zur Realisierung von Impedanzmessungen in einer Vier-Elektroden-Anordnung in jedem Kanal eine Elektrode 10<sup>b</sup> zur Stromeinspeisung und eine zur Potentialableitung 10<sup>c</sup> angeordnet.

**Bezugszeichenliste**

- 1 Bioreaktor
- 2 Sphäroid
- 3 Biosensor, Messanordnung
- 4 Impedanzmessanordnung
- 5 Potenzialableitungsanordnung
- 6 Auswerteparameter
- 7 Messkammer
- 8 Kapillare
- 9 Messkammerwand
- 10 Elektrode
- 10\* Leiterbahn
- 10' Elektrode zur Stromeinspeisung
- 10" Elektrode zur Potenzialableitung
- 11 Nicht organisierter Bereich
- 12 Organisierter Bereich, elektrophysiologischer Bereich
- 13 Innere Faserschicht
- 14 Substrat
- 15 Membran
- 16 Mikroloch
- 17 Photolack
- 18 Unterdruckanschluss
- 19 Kulturflüssigkeit
- 20 Multiplexer
- 21 Impedanzsystem
- 22 Potenzialbleitungssystem
- 23 Datenerfassungs- und analysesystem
- 24 Verbindungskammer

## Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Erfassen bioelektrischer Signale aus Sphäroiden mit
  - einer Messkammer mit einer Messkammerwand, die ein zumindest einseitig offenes Volumen umschließt, aus elektrisch nicht leitendem Material besteht und zumindest in einem Messbereich einen Innenquerschnitt aufweist, der maximal dem größten Querschnitt eines Sphäroids entspricht,
  - mindestens einer Anzahl von Elektroden, die in einer gemeinsamen Ebene innerhalb der Messkammerwand angeordnet sind und jeweils eine, zum Messbereich orientierte frei zugängliche Elektrodenoberfläche aufweisen, sowie
  - einer Impedanzmessanordnung, die mit den Elektroden verbunden sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass ein Potenzialableitungssystem mit den Elektroden verbunden ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Messkammer in Art einer zylindrischen Kapillare ausgebildet ist,  
dass die mindestens eine Anzahl von Elektroden in einer Ebene orthogonal zur Längserstreckung der Kapillare angeordnet ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, dass die frei zugänglichen Elektrodenoberflächen der Elektroden bündig mit der Messkammerinnenwand ausgebildet sind.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, dass innerhalb der Messkammerwand eine Anzahl von Verbindungskammern vorgesehen sind, die mit dem Messbereich offen verbunden

sind und in einer gemeinsamen Ebene, im Umfangsrichtung um den Messbereich gleich verteilt angeordnet sind, und  
dass innerhalb der Verbindungskammern jeweils eine Elektrode eingebracht ist,  
deren  
zum Messbereich orientierte frei zugängliche Elektrodenoberfläche von der  
Messkammerinnenwand beabstandet ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch **gekennzeichnet**, dass die Messkammer mit einer elektrisch leitenden  
Flüssigkeit befüllbar ist.
7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6,  
dadurch **gekennzeichnet**, dass innerhalb der Verbindungskammern jeweils eine  
zweite Elektrode vorgesehen ist, die mit dem Potenzialableitungssystem verbunden  
ist.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch **gekennzeichnet**, dass mit der Messkammer eine Unterdruckleitung  
verbunden ist.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
dadurch **gekennzeichnet**, dass die Messkammer topfartig ausgebildet ist, und  
dass am Topfboden eine Unterdruckleitung vorgesehen ist, zur Positionierung und  
Fixierung eines in die topfartige Messkammer eingebrachten Sphäroids mittels  
Unterdruck.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,  
dadurch **gekennzeichnet**, dass die Impedanzmessanordnung sowie das  
Potenzialableitungssystem über einen Multiplexer mit den Elektroden verbunden  
sind.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,  
dadurch gekennzeichnet, dass eine Datenerfassungs- und Datenauswerteeinheit  
mit der Impedanzmessanordnung sowie dem Potenzialableitungssystem verbunden  
ist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,  
dadurch gekennzeichnet, dass eine Vielzahl von Messkammern arrayförmig  
angeordnet und in planarer Halbleiterstrattechnik ausgebildet ist.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden in Umfangsrichtung der  
Messkammerwand gleich verteilt angeordnet sind.

14. Verfahren zur Erfassung bioelektrischer Signale aus Sphäroide durch die  
Kombination folgender Verfahrensschritte:

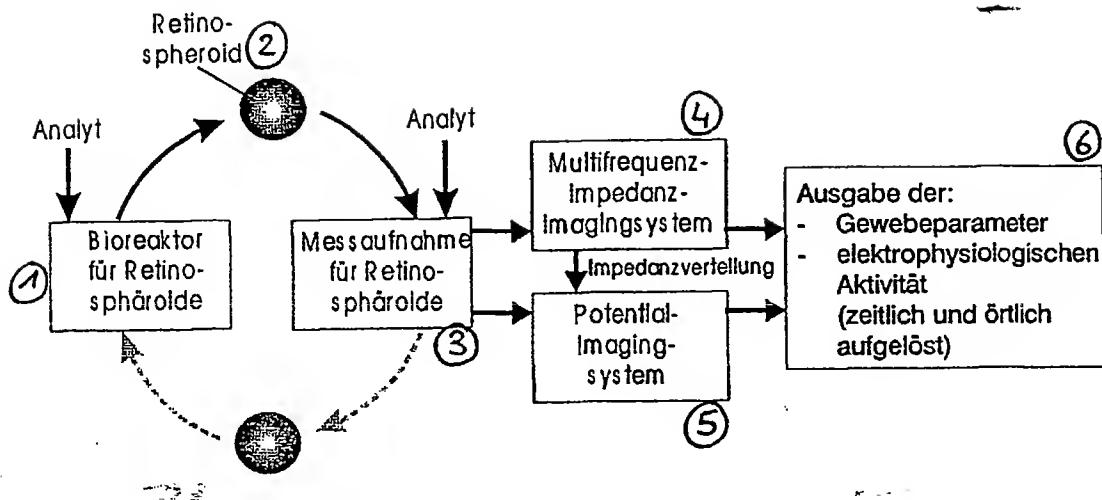
- Bereitstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
- Einbringen und Positionieren eines Sphäroids innerhalb der Messkammer
- Durchführen einer Impedanzmessung nach der Impedanzimaging-Methode  
zur ortsaufgelösten Bestimmung elektrophysiologisch aktiver Bereichen in dem  
Sphäroid.

15. Verfahren nach Anspruch 14,  
dadurch gekennzeichnet, dass eine Oberflächenpotenzialmessung zur Erfassung  
der bioelektrischen Aktivität durchgeführt wird.

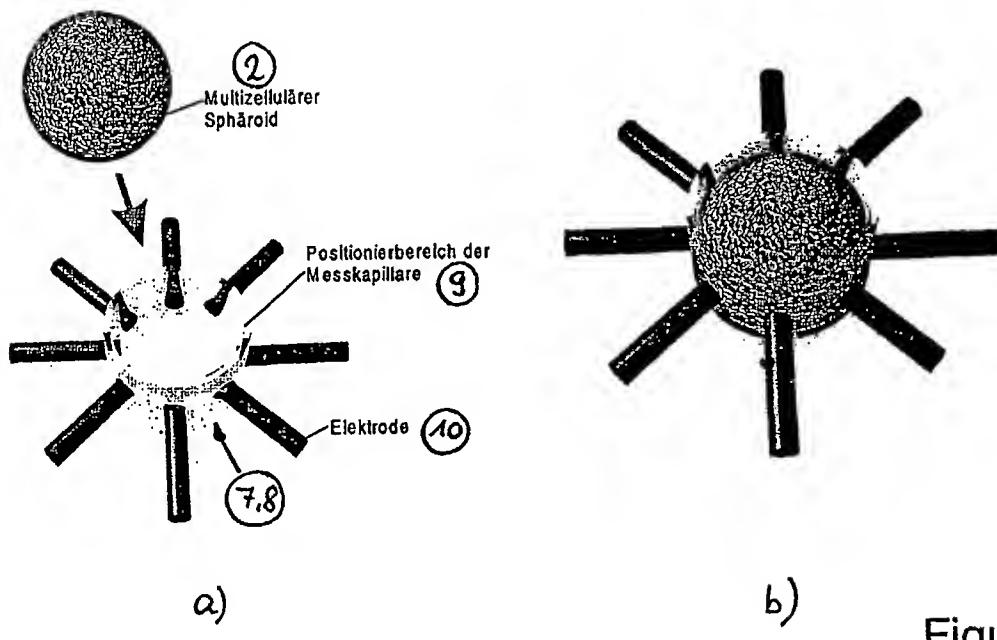
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Impedanzmessung bei unterschiedlichen  
Anregungsfrequenzen durchgeführt wird, um ein Impedanzspektrum zu erhalten.

17. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur  
Untersuchung der Wirkung von Wirkstoffen auf Sphäroide.

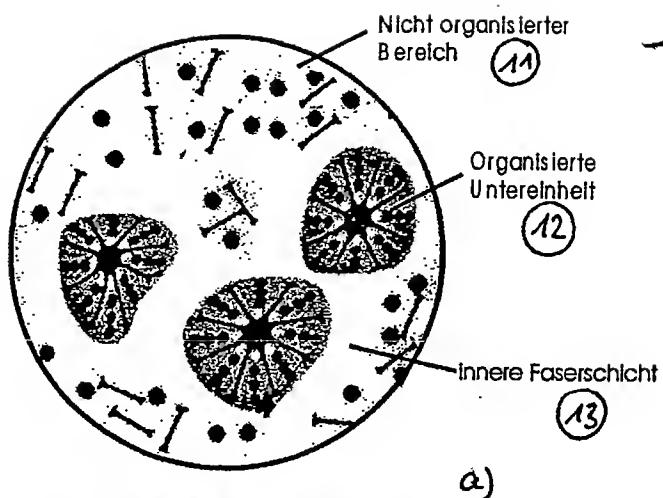
18. Verwendung nach Anspruch 17,  
dadurch **gekennzeichnet**, dass die Wirkstoffe pharmazeutische Wirkstoffe ,  
insbesondere neuropharamakologische oder neurotoxische Substanzen sind.
  
19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18,  
dadurch **gekennzeichnet**, dass in einem ersten Schritt ein mit einem Wirkstoff  
versetzter Sphäroid aus einem Kulturmedium entnommen und in die Messkammer  
der Vorrichtung eingebracht wird,  
in einem darauffolgenden Schritt wird die Impedanzmessung und/oder die  
Potenzialableitung non invasiv am Sphäroid durchgeführt und  
in einem letzten Schritt wird das Sphäroid in das Kulturmedium schadlos zurück  
verbracht.



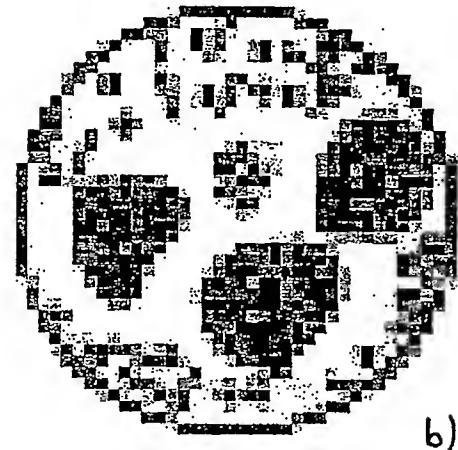
Figur 1



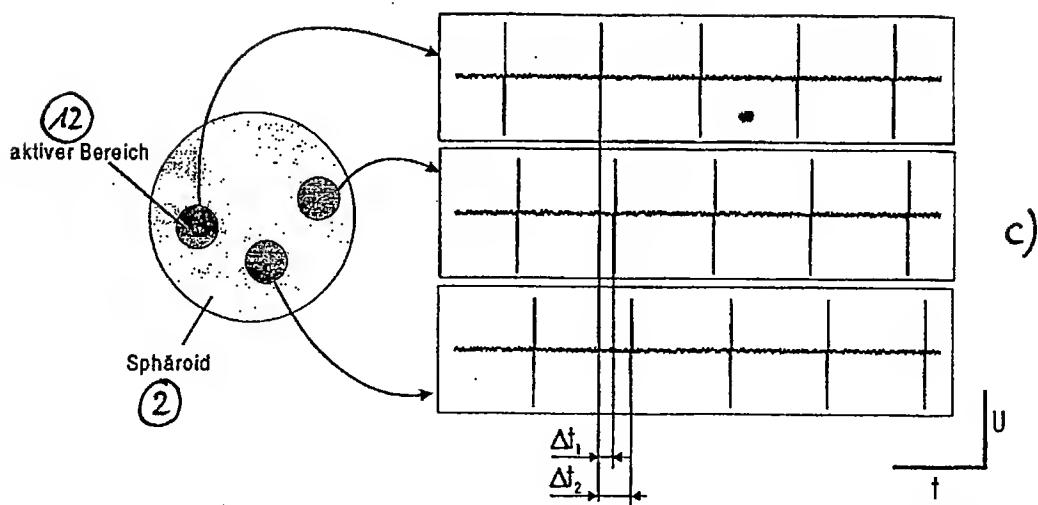
Figur 2



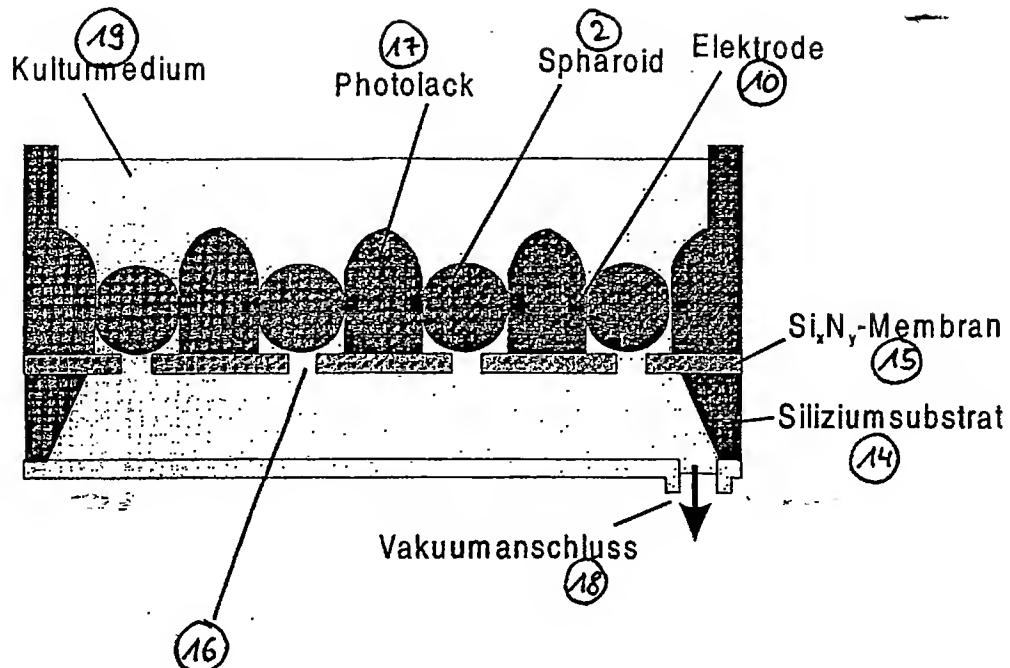
a)



b)

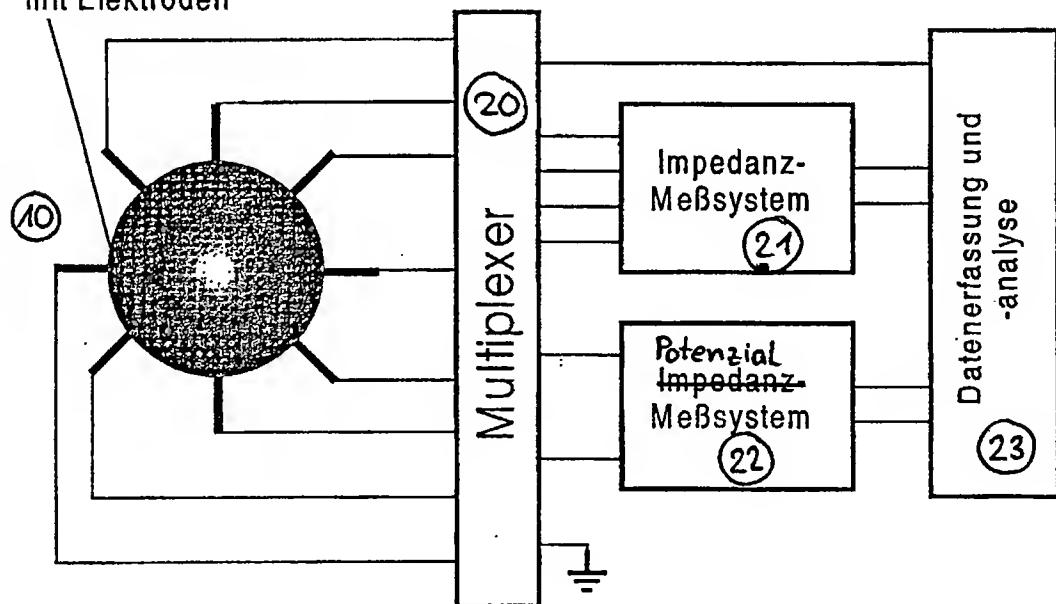


Figur 3

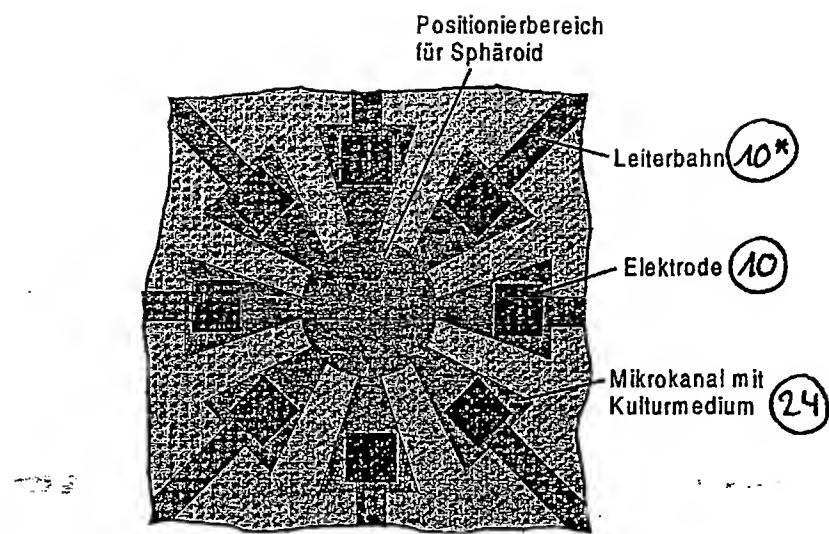


Figur 4

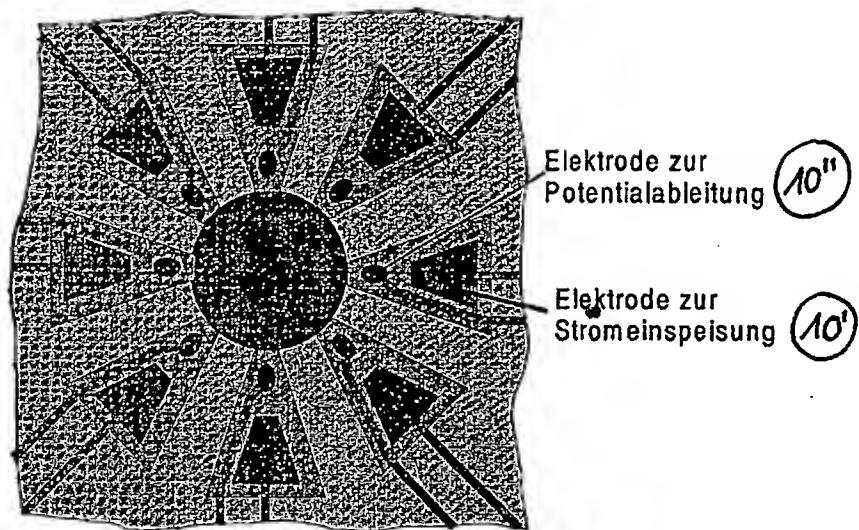
Messaufnahme für Sphäroide mit Elektroden



Figur 5



Figur 6



Figur 7

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. März 2003 (13.03.2003)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/020125 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/487**, C12M 1/34

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/09267

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 2002 (20.08.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 101 42 393.4 30. August 2001 (30.08.2001) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.** [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, 81241 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **THIELECKE, Hagen** [DE/DE]; Hasseler Chaussee 23, 66386 St. Ingbert (DE). **ROBITZKI, Andrea** [DE/DE]; Brunhildstrasse 8, 68519 Vierheim (DE).

(74) Anwalt: **RÖSLER, Uwe**; Landsberger Strasse 480a, 81241 München (DE).

(81) Bestimmungsstaat (*national*): US.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

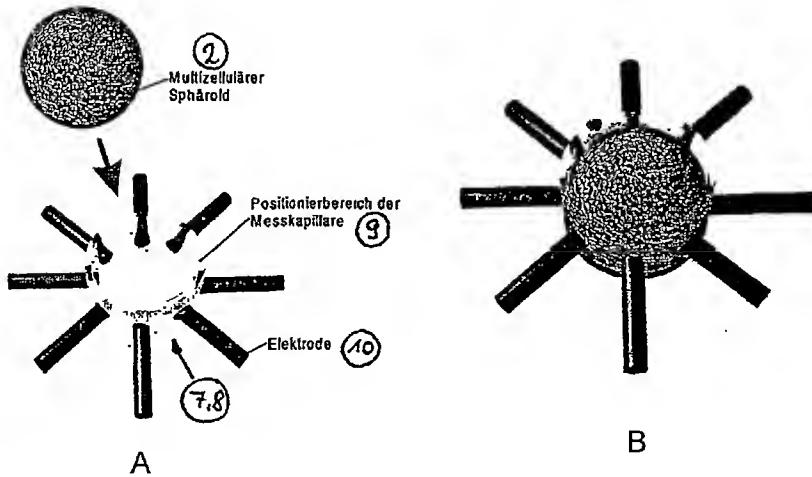
Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 27. November 2003

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DETECTING BIOELECTRIC SIGNALS FROM ELECTROPHYSIOLOGICALLY ACTIVE REGIONS IN SPHEROIDS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR ERFASSUNG BIOELEKTRISCHER SIGNALE AUS ELETROPHYSIOLOGISCH AKTIVEN BEREICHEN IN SPHÄROIDEN



2... MULTICELLULAR SPHEROID  
9... POSITIONING REGION OF THE MEASURING CAPILLARIES  
10... ELECTRODE

**WO 03/020125 A3**

(57) Abstract: The invention relates to a device and a method for detecting bioelectric signals from spheroids. Said device comprises a measuring chamber having a wall enclosing a volume which is open on at least one side, consisting of non-electroconductive material, and comprising an inner cross-section at least in a measuring area, corresponding as far as possible to the largest cross-section of a spheroid. The inventive device also comprises at least a number of electrodes which are arranged in a common plane inside the wall of the measuring chamber, and each comprise one freely accessible electrode surface which is oriented towards the measuring area. Said device further comprises an impedance measuring system which is connected to the electrodes. The device and the method can be used in active ingredients tests on biological in vitro 3D (three-dimensional) cell agglomerates.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("*Guidance Notes on Codes and Abbreviations*") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

---

**(57) Zusammenfassung:** Beschrieben wird eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum Erfassen bioelektrischer Signale aus Sphäroiden mit einer Messkammer mit einer Messkammerwand, die ein zumindest einseitig offenes Volumen umschliesst, aus elektrisch nicht leitendem Material besteht und zumindest in einem Messbereich einen Innenquerschnitt aufweist, der maximal dem grössten Querschnitt eines Sphäroids entspricht, mindestens einer Anzahl von Elektroden, die in einer gemeinsamen Ebene innerhalb der Messkammerwand angeordnet sind und jeweils eine, zum Messbereich orientierte frei zugängliche Elektrodenoberfläche aufweisen, sowie einer Impedanzmessanordnung, die mit den Elektroden verbunden sind. Die Vorrichtung sowie das Verfahren lassen sich zu Wirkstofftests an biologischen in vitro 3D (dreidimensionalen) Zellaggregaten einsetzen.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

internal Application No  
PCT/EP 02/09267A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 GO1N33/487 C12M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 GO1N C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOLCKOVSKY A ET AL: "Monitoring of cell and tissue responses to photodynamic therapy by electrical impedance spectroscopy" PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY, APRIL 2001, IOP PUBLISHING, UK, vol. 46, no. 4, pages 983-1002, XP002243462 ISSN: 0031-9155 abstract page 986; figure B --- -/-	1,2,4, 6-8, 10-19

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 June 2003

Date of mailing of the international search report

23/06/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Michalitsch, R

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>THIELECKE H ET AL: "A novel cell-positioning technique for extracellular recording and impedance measurement on single cells using planar electrode substrates"</p> <p>ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY, 1998. PROCEEDINGS OF THE 20TH ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE HONG KONG, CHINA 29 OCT.-1 NOV. 1998, PISCATAWAY, NJ, USA, IEEE, US, 29 October 1998 (1998-10-29), pages 2872-2875, XP010320726 ISBN: 0-7803-5164-9 page 2872 -page 2874; figures 1-5</p>	1,2,4, 6-8, 10-19
A	<p>DE 199 46 458 A (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG) 5 April 2001 (2001-04-05) cited in the application abstract column 4 claims 1,2 figures 1-3</p>	1-19
A	<p>GB 2 232 769 A (FISHER TIMOTHY CHARLES ;FISHER DR TIMOTHY CHARLES (US)) 19 December 1990 (1990-12-19) abstract figures 1,2</p>	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 02/09267

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19946458	A 05-04-2001	DE 19946458 A1 WO 0123865 A1 EP 1221032 A1	05-04-2001 <del>05-04-2001</del> 10-07-2002
GB 2232769	A 19-12-1990	NONE	

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 GO1N33/487 C12M1/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 GO1N C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	MOLCKOVSKY A ET AL: "Monitoring of cell and tissue responses to photodynamic therapy by electrical impedance spectroscopy" PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY, APRIL 2001, IOP PUBLISHING, UK, Bd. 46, Nr. 4, Seiten 983-1002, XP002243462 ISSN: 0031-9155 Zusammenfassung Seite 986; Abbildung B ---	1,2,4, 6-8, 10-19

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- <sup>b</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsatum veröffentlicht worden ist
- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
5. Juni 2003	23/06/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Michalitsch, R

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	THIELECKE H ET AL: "A novel cell-positioning technique for extracellular recording and impedance measurement on single cells using planar electrode substrates" ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY, 1998. PROCEEDINGS OF THE 20TH ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE HONG KONG, CHINA 29 OCT.-1 NOV. 1998, PISCATAWAY, NJ, USA, IEEE, US, 29. Oktober 1998 (1998-10-29), Seiten 2872-2875, XP010320726 ISBN: 0-7803-5164-9 Seite 2872 -Seite 2874; Abbildungen 1-5	1,2,4, 6-8, 10-19
A	DE 199 46 458 A (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG) 5. April 2001 (2001-04-05) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Spalte 4 Ansprüche 1,2 Abbildungen 1-3	1-19
A	GB 2 232 769 A (FISHER TIMOTHY CHARLES ; FISHER DR TIMOTHY CHARLES (US)) 19. Dezember 1990 (1990-12-19) Zusammenfassung Abbildungen 1,2	1-19

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19946458	A 05-04-2001	DE 19946458 A1 WO 0123865 A1 EP 1221032 A1	05-04-2001 ← 05-04-2001 10-07-2002
GB 2232769	A 19-12-1990	KEINE	